

PCT/JPC3/17020

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

26.12.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 3月20日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-078977  
[ST. 10/C]: [JP2003-078977]

REC'D 19 FEB 2004

WIPO

PCT

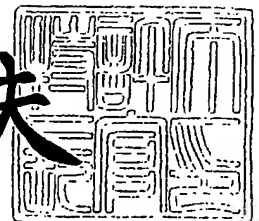
出 願 人  
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所  
株式会社ニチレイ

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月 6日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3007234

【書類名】 特許願

【整理番号】 J10652A1

【提出日】 平成15年 3月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 F25C 1/00

【発明の名称】 含水物中における物質の凍結濃縮を抑制する方法、生理活性物質の失活を抑制する方法、および成分が均質に拡散した凍結物又は凍結乾燥物を製造する方法

【請求項の数】 3

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区月寒東 2 条 1 7 丁目 2 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内

【氏名】 津田 栄

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区月寒東 2 条 1 7 丁目 2 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内

【氏名】 三浦 愛

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区新港 9 株式会社ニチレイ 技術開発センター内

【氏名】 平山 泰

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区新港 9 株式会社ニチレイ 技術開発センター内

【氏名】 井上 敏文

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区新港 9 株式会社ニチレイ 技術開発センター内

【氏名】 北河 章宏

## 【特許出願人】

【持分】 050/100  
【識別番号】 301021533  
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所  
【代表者】 吉川 弘之

## 【特許出願人】

【持分】 050/100  
【識別番号】 000134970  
【氏名又は名称】 株式会社ニチレイ

## 【代理人】

【識別番号】 100106909  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 棚井 澄雄

## 【代理人】

【識別番号】 100064908  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 志賀 正武

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100101465  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 青山 正和

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100094400  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 鈴木 三義

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100106057  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 柳井 則子



【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008707

【納付金額】 10,500円

【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合 0 5 0 / 1 0 0

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 含水物中における物質の凍結濃縮を抑制する方法、生理活性物質の失活を抑制する方法、および成分が均質に拡散した凍結物又は凍結乾燥物を製造する方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 水分子及び水分子以外の物質を含む含水物を凍結する際における該含水物中における前記物質の凍結濃縮を抑制する方法であって、該含水物に不凍タンパク質を添加することを特徴とする含水物中における物質の凍結濃縮を抑制する方法。

【請求項 2】 生理活性物質を含む含水物を凍結する際における該生理活性物質の失活を抑制する方法であって、該含水物に不凍タンパク質を添加することを特徴とする生理活性物質の失活を抑制する方法。

【請求項 3】 水分子及び水分子以外の成分を含む含水物を凍結又は凍結乾燥させて、該成分が均質に拡散した凍結物又は凍結乾燥物を製造する方法であって、該水溶液に不凍タンパク質を添加することを特徴とする成分が均質に拡散した凍結物又は凍結乾燥物を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】


【発明の属する技術分野】

本発明は、含水物中における物質の凍結濃縮を抑制する方法、生理活性物質の失活を抑制する方法、および成分が均質に拡散した凍結物又は凍結乾燥物を製造する方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

水分子及び水分子以外の物質（溶質、混入物、夾雑物など；以下、媒質という）を含む含水物を凍結させると、水分子同士が、媒質を排除しながら結晶化して水分子のみからなる氷結晶を形成する。そのため、凍結時に、含水物中で媒質が不均一に拡散し、この氷結晶以外の場所に追いやられて溜まる現象、すなわち凍結濃縮（f r e e z e c o n c e n t r a t i o n）が発生することが知られ



ている。

従来より、この凍結濃縮は、例えば濃縮果実ジュースを生産する飲料技術や、食品、医療、廃水处理等において利用されている。

#### 【0003】

凍結濃縮を利用する技術が進む一方、凍結濃縮を抑制する技術は、広範な利用性があるにも関わらず進んでいない。

例えば、細胞を凍結した場合、凍結濃縮に伴う水分子の移動と氷の形成が細胞内に起こるため、細胞の内部構造と内容物は、大きく移動したり、圧迫、損傷を受けてしまう。その結果、凍結した細胞を解凍した後、凍結前の状態を回復することが困難となる。そのため、生体由来の細胞、例えば精子や卵子、血球等を含む血液などを凍結させた際にその細胞が破壊されたり、肉類や野菜類などを凍結させた際にその味が損なわれるといった現象が生じる。同様に、例えば酵素等のタンパク質や各種医薬品等の生理活性物質の水溶液を凍結させた場合、その生理活性が大きく失われてしまう。したがって、凍結濃縮を抑制する技術は非常に重要である。

#### 【0004】

このような凍結濃縮を抑制する方法は、医療分野において、血液、精子、卵子、組織、臓器等の多くの物質の凍結保存のために望まれている。

また、食品分野においても、食肉、野菜、魚介類、氷菓子、加工食品などを凍結させた場合に、凍結濃縮によってこれらの食品の内部構造が破壊され、各種栄養成分やうまみ成分、添加物等を氷以外の部分に追いやる結果、著しい品質低下が起こることが問題となる。そのため、食品分野においても凍結濃縮を効果的に抑制する方法が望まれている。

また、医薬品や食品の製造において利用されている技術に凍結乾燥技術があるが、この凍結乾燥においても、凍結濃縮を抑制することは重要である。すなわち、凍結濃縮が生じると、医薬品成分や各種うまみ成分が均一に分散せず、製品（凍結乾燥物）の著しい品質低下を引き起こす。

さらに、飲食店で用いられる氷（製氷業分野）や、寒冷地で行われる氷祭り、あるいは氷像フェスティバル等においては、赤や青に均質に着色されたディスプ

レイ用の氷が求められている。しかしながら、均質に着色された氷を製造することは難しく、手間やコストもかかってしまう。そのため、色素等の成分が均質に分散した凍結物等を製造する技術が望まれている。

#### 【0005】

一方、アイスクリーム等の冷凍食品の品質を向上させる方法の1つとして、不凍タンパク質 (Antifreeze Protein、以下、AFPということがある) を用いる方法が提案されている。例えば特許文献1では、天然資源からAFPを回収する方法、及びAFPを含む冷凍食品が開示されている。また、特許文献2では、組み換えDNA技術により生成された不凍剤ペプチドが開示されており、これをアイスクリームのような食品に適用できるとの報告もある。

#### 【0006】

##### 【特許文献1】

特表2000-515751号公報

##### 【特許文献2】

国際公開 (WO) 90/13571号公報

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

AFPは、凍結温度域において生成する微細な氷結晶 (氷核) の表面に特異的に吸着することにより、氷核の成長を阻害するという他に例のない性質を有する生体物質である。しかしながら、AFPが、これらの内部で発生する凍結濃縮を抑制することについては知られていない。

したがって、本発明の目的は、AFPを用いた凍結濃縮抑制技術を提供することである。

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、凍結濃縮抑制を検証するための端的なモデル実験系として、色インクを滴下して着色した水を凍結させ、このときに発生するインク成分の凍結濃縮をカメラ撮影により検証する方法を考案した。そして、色インクで着色された水にAFPの凍結乾燥粉末を溶解し、これがインク成分の凍結濃縮を阻害するか

否かについて鋭意研究を行ったところ、AFPの添加により、インク成分の凍結濃縮が著しく軽減され、その結果、全体が均質に着色された着色氷が形成されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

#### 【0009】

すなわち、前記課題を解決する本発明の第一の発明は、水分子及び水分子以外の物質を含む含水物を凍結する際における該含水物中における前記物質の凍結濃縮を抑制する方法であって、該含水物に不凍タンパク質を添加することを特徴とする含水物中における物質の凍結濃縮を抑制する方法（以下、凍結濃縮抑制方法ということがある）である。

前記課題を解決する本発明の第二の発明は、生理活性物質を含む含水物を凍結する際における該生理活性物質の失活を抑制する方法であって、該含水物に不凍タンパク質を添加することを特徴とする生理活性物質の失活を抑制する方法（以下、失活抑制方法ということがある）である。なお、本明細書における「生理活性物質」という単語は、全ての「生理的な活性を有する物質」を指し示す。

前記課題を解決する本発明の第三の発明は、水分子及び水分子以外の成分を含む含水物を凍結又は凍結乾燥させて、該成分が均質に拡散した凍結物又は凍結乾燥物を製造する方法であって、該水溶液に不凍タンパク質を添加することを特徴とする成分が均質に拡散した凍結物又は凍結乾燥物を製造する方法（以下、凍結物製造方法ということがある）である。

#### 【0010】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明をより詳細に説明する。

##### 《凍結濃縮抑制方法》

本発明の凍結濃縮抑制方法は、水分子及び水分子以外の物質を含む含水物を凍結する際、該含水物に不凍タンパク質を添加することを特徴とする方法である。

「水分子及び水分子以外の物質を含む含水物」としては特に制限はなく、液体でも、固体であってもよい。例えば、我々の身近なものとしては、溶質と溶媒からなる水溶液、水に溶解しない物質と水との混合液、穀類、麺類、野菜、果実、肉類、魚介類、氷菓子、加工食品、医療品、診断薬、試薬、化粧品、血液、精子



、卵子、細胞、組織、臓器などが挙げられる。

本発明において、「タンパク質」とは、アミノ酸が複数個以上ペプチド結合で連結した物質のことである。慣例的に30残基程度までの小さいタンパク質をペプチドと称して、これをタンパク質と区別する場合があるが、本発明で用いている「不凍タンパク質」という物質名は、不凍能力を有するペプチド及びタンパク質を区別せずに、両方を含むものとする。

#### 【0011】

A F Pは、魚類等の生体内において、凍結温度域で細胞内に生成する氷結晶の表面に特異的に結合してその成長を食い止め、組織の凍結から身を守る生体防御物質である。A F Pは、約35年前に南極海に生息するノトセニア科の魚類の血液から初めて発見され、それ以来今日まで、主として北極海、南極海、およびラブラドル湾周辺に生息する魚類について研究がなされてきた。近年、魚類以外にも菌類、昆虫、植物などからもA F Pが発見され、それらの構造と機能の解明は現在も世界中で続けられている。

なお、A F Pの不凍能力は、添加された含水物の凝固点をどれだけ降下させることができるか（熱ヒステリシス（℃））によって評価されている。

#### 【0012】

魚類由来のA F Pはその構造によりI～IV型の4つの型に分類されている。I型はA l a含有量が高く、T h rとA s p残基が等間隔で配置されており $\alpha$ -ヘリックス構造を形成している。II型は高いC y s含量（8%）を持ち、C型-レクチンと類似の構造を形成している。III型はらせん様の球状構造をもつタンパク質である。IV型はG l n残基の含有量が高く、 $\alpha$ -ヘリックスの束構造を有することが予想されている。

A F Pは、両親媒性を有しており、I型、II型などのタイプによらず、水に対して高濃度で溶解する性質を有している。

#### 【0013】

本発明において用いられるA F Pは、I～IV型のいずれのタイプであってもよいが、入手しやすさ、コスト等の点から、I型、II型及びIII型のものが好ましく用いられる。

A F P は、ウシ臍臓アプロチニン（質量平均分子量： $M_w=6,500$ ）、ニワトリ卵白リゾチーム（ $M_w=14,000$ ）、大豆トリプシンインヒビター（ $M_w=21,500$ ）を標準物質としてゲル濾過クロマトグラフィーで測定される  $M_w$  が 1,500 であると細胞への浸透性に優れるため好ましい。

#### 【0014】

A F P による凍結濃縮抑制効果を得るためには、A F P を、含水物中の A F P 濃度が、含水物の質量に対し、0.02 質量%以上となる量添加することが好ましい。特に、A F P 濃度が 0.03 質量%から 0.05 質量%の範囲内であると、最大の凍結濃縮抑制効果が得られると同時に、コストも抑えられるため好ましい。

#### 【0015】

本発明において、含水物に対する A F P の添加方法は、特に制限はなく、含水物の種類によって適宜、公知の手法を選択して用いることができる。

例えば含水物が液体（水溶液、血液等）である場合は、A F P の粉末又は水溶液を、そのまま混合すればよい。また、含水物が細胞、組織等である場合は、注射器などを用いて A F P の水溶液を含水物の内部に注入しても良い。また、含水物を A F P の水溶液に浸した後に  $50\sim2,000\text{ kg/cm}^2$  に加圧する等の手段により、含水物内部に A F P を浸透させても良い。

#### 【0016】

A F P を添加する際、含水物の p H を、 $2.0\sim11.0$  とすることが好ましく、 $4.0\sim8.0$  とすることがより好ましい。含水物の p H をこの範囲内とすると、A F P の変性による凍結濃縮抑制効果の低下を防ぐことができる。

また、A F P を添加する際、含水物の温度は、 $0\sim70^\circ\text{C}$  とすることが好ましく、 $4\sim30^\circ\text{C}$  とすることがより好ましい。含水物の温度をこの範囲内とすると、A F P の変性による凍結濃縮抑制効果の低下を防ぐことができる。

#### 【0017】

本発明において、含水物の凍結は、家庭用又は業務用の冷凍庫、冬期の零度 C 以下の野外など、含水物の種類に応じ、一般的に用いられている凍結手段を適宜選択して行うことができる。

含水物を凍結させる温度は、含水物中の水以外の物質の濃度、AFPの不凍能力、AFPの添加量等を考慮して適宜設定すればよいが、好ましくは $-10^{\circ}\text{C}$ 以下、より好ましくは $-10\sim-80^{\circ}\text{C}$ である。凍結温度が低いほど、AFPの凍結濃縮抑制効果が発揮されやすいため好ましい。

#### 【0018】

次に、図1を用いて、凍結温度域における水の凍結現象を説明する。

図1の上段はAFPを添加しない場合（AFP-）であり、図1の下段はAFPを添加した場合（AFP+）である。

AFP-の場合（図1上段）、水を凍結温度域にさらすと（左図）、水分子が互いに結びついてネットワークを形成し、やがて水中に氷核（ice nucleation particleまたはembryo ice crystal）と呼ばれる氷結晶が水中に無数に出現して（中央図）各々が結晶成長を起こす。大きくなった氷核同士は、互いに結びついて集合体を形成する（右図）。この結晶成長をした氷核の集合体が一般的に言う「氷」である。

#### 【0019】

一方、AFP+の場合（図1下段）、AFP（図中、○で示す）は、凍結温度域において生成する氷核の単結晶上の氷層平面に対して特異的に結合し、その成長を抑制する（中央図）。その結果、水中に、AFPにより氷層平面が覆われ、個々に独立した微細な氷核が多数形成される（右図）。

AFPにより氷層平面が覆われた氷核は、図1のA、Bで示されるようなバイピラミダル氷結晶、結晶学的には六方両錐体（A）あるいは六方偏四角面体（B）と呼ばれる氷結晶を生成するが多い。

この氷結晶は、長軸（c軸）方向の長さがおよそ $50\sim500\mu\text{m}$ の範囲にある微細なものであり、AFPのタイプや水溶液条件によつては、完全なバイピラミダル氷結晶が生成しないか、あるいは違う形の氷結晶を生成する場合があるが、いずれの場合でも、AFPの結合が原因となり、多数の微細な氷結晶が形成される。

#### 【0020】

次に、凍結濃縮のメカニズム、及びAFPによる凍結濃縮抑制のメカニズムを

説明する。図2のA～CはAFPを添加しない場合（AFP-）であり、図2のD～FはAFPを添加した場合（AFP+）である。

#### 【0021】

凍結濃縮は、以下のようなメカニズムによって生じると推測される。すなわち、上述したように、凍結現象が生じる際、水分子は互いに結びついてネットワークを形成する。このとき、水分子は、水分子同士だけで互いに結びつき、より大きなサイズに成長し続けるという性質を有する。そのため、このネットワークが形成される際、水分子以外の物質はことごとく、その種類や量に関わらず、該ネットワーク内から物理的に排除される。その結果、水分子以外の物質が、該ネットワークの形成されていない部位へと移動（不均一拡散）し、凍結濃縮が生じる。

たとえば、図2 A～Cに示すように、赤色のインクを滴下して出来る赤い色水は、図2のAの模式図で示されるように、微視的には水中において赤色のインク成分（図中、●で示す）が均一に分散したものである。このような色水を入れた容器を冷凍庫内に静置すると、時間経過とともに、冷やされた庫内に接触している容器の底面部分から氷核が発生し、これらが結晶成長して氷となる。このときインク成分は、凍結濃縮効果を受けて一方向に追いやられる（図2 B）。さらに時間が経過してインク成分の凍結濃縮が進むと、巨視的には氷部分と色素部分とが分離した氷が出来上がる（図2 C）。

#### 【0022】

一方、赤色のインクを滴下した水にAFPを加えたものを用意して（図2 D）、これを上記と同様に冷凍庫内に静置した場合、冷やされた庫内に接触している容器の底面部分から発生する氷核に対してAFPが結合する。

このAFPの結合により、上述したように、氷核が結晶成長抑制を受け、c軸方向に結晶成長して、微細な大きさ（50～500  $\mu\text{m}$ 程度）のバイピラミダル氷結晶などに変形する。このようなバイピラミダル氷結晶は、互いに結びつきにくい性質を有しており、氷結晶間に隙間が形成される。また、バイピラミダル氷結晶とAFPとの結合は、結晶間に存在している自由水のさらなる結合を阻止して氷結晶が大きくなることを抑制すると同時に、色素成分の移動を抑制する。そ

の結果、インク成分は一方向に追いやられることなく氷結晶との混合状態を形成する（図 2 E）。

そして、インク成分の不均質拡散が抑制された状態で、色水中の全体にバイピラミダル氷結晶が形成され、最終的に、図 2 F に示すように、色インク成分と氷結晶とが均一に分散した状態となる。

つまり、含水物の凍結に伴って形成される微細なバイピラミダル氷結晶間の間隙にインク成分が保持されるため、インク成分の不均質拡散が抑制され、凍結濃縮が著しく軽減されると考えられる。

### 【0023】

水分子と、水分子以外の物質とを含む含水物は、すべからく上述した図 1 上段及び図 2 A～C の模式図で説明される様式に従い凍結する。すなわち、含水物をマイナス温度下に晒した場合、氷核がこれらの内部において生成し、互いに結びついて氷となり、さらなる成長と結合を繰り返して大きな氷結晶（氷塊）を形成していく。

上述した穀類、麺類、野菜、果実、肉類、魚介類、氷菓子、加工食品、医療品、診断薬、試薬、化粧品、血液、精子、卵子、細胞、組織、臓器などは、それぞれ、多様な内部構造を有しており、水及び水以外の構成物の量や種類も大きく異なっている。しかしながら、凍結濃縮という観点において、これらは本質的には「水分子」と「水分子以外の物質」の 2 種類から構成される含水物と見なすことができるため、これらの凍結現象も模式的に図 1 上段及び図 2 A～C で表すことができる。この場合、図 2 中の●は「水分子以外の物質」を表す。

したがって、AFP が存在している場合には、これらの含水物中に含まれる「水分子以外の物質」は、図 2 D～F に示すように、氷の形成にともなう大きな移動を強制されることがなく、該物質の濃縮によって該物質同士が接近し、互いに圧迫したり損傷を与えたりしにくくなる。その結果として、解凍後も凍結前の状態を維持することができる。

### 【0024】

#### 《失活抑制方法》

本発明の失活抑制方法は、生理活性物質を含む含水物を凍結する際、該含水物

に不凍タンパク質を添加することを特徴とする方法である。

本明細書における「生理活性物質」という単語は、全ての「生理的な活性を有する物質」を指し示すものである。本発明の失活抑制方法が適用される生理活性物質としては、特に、生体に由来する物質、例えば抗生物質、機能性食品添加物、細胞分化誘導物質、機能性脂質（DHA、EPA等）、低分子化合物、ホルモン、ビタミン、ペプチド、酵素、抗体、タンパク質などが好適である。また、「含水物」としては、当該生理活性物質を含有する水溶液、生体細胞、組織、臓器、血液等の体液、細菌、ウイルス等の微生物などが挙げられる。

#### 【0025】

「生理活性物質を含む含水物」及び「生理活性物質」は、前述した凍結濃縮抑制方法における「含水物」及び「水分子以外の物質」に相当し、AFPの添加により生理活性物質の凍結濃縮が抑制される。その結果、タンパク質やその他各種細胞を構成する成分（細胞壁、脂質、核酸等）が、圧迫、損傷を受けることがなく、生理活性物質の活性が維持される。

本発明の失活抑制方法を行うための条件、すなわち、生理活性物質を含む含水物に対するAFPの添加量、AFPを添加する際の該含水物のpH、温度等の条件は、前述した凍結濃縮抑制方法において述べた条件と同様である。

生理活性物質を含む含水物中における生理活性物質の濃度に特に制限はなく、好ましくは $1\text{ ng/ml} \sim 50\text{ mg/ml}$ 、より好ましくは $50\text{ ng/ml} \sim 30\text{ mg/ml}$ である。生理活性物質の濃度がこの範囲内であると、AFPによる失活抑制効果が高く好ましい。

#### 【0026】

##### ＜凍結物製造方法＞

本発明の凍結物製造方法は、水分子及び水分子以外の成分を含む含水物を凍結又は凍結乾燥する際、該含水物に不凍タンパク質を添加することを特徴とする方法である。

凍結物としては、アイスクリーム、シャーベット、かき氷等の氷菓、ディスプレイ用の氷、飲食用の氷（球型氷など）、冷凍肉、冷凍魚、冷凍野菜、冷凍果実、冷凍麺、調理済冷凍食品、凍結臓器、凍結細胞、凍結体液、凍結精子、凍結卵

子、凍結試薬、凍結診断薬等が挙げられる。

凍結乾燥物としては、凍結乾燥により製造される医薬品、粉末状のフリーズドライ食品などが挙げられる。

また、水分子以外の成分としては、特に制限はないが、例えば医療分野においては、凍結乾燥により製造される医薬品に含まれる、生理活性を有する又は有さない各種成分などが挙げられる。また、食品分野においては、粉末状又は液状の食品、糖類などの調味料、各種食品添加物などが挙げられる。また、ディスプレイ用の氷等の場合には、顔料や染料等の色素などが挙げられる。

#### 【0027】

「水分子以外の成分を含む含水物」及び「水分子以外の成分」は、前述した凍結濃縮抑制方法における「含水物」及び「水分子以外の物質」に相当し、AFPの添加により各種成分の凍結濃縮が抑制される。その結果、色素等の成分が、凍結物又は凍結乾燥物全体に均一に分散した凍結物又は凍結乾燥物を得ることができる。なお、凍結乾燥処理の操作は、従来に行われている周知の方法により行うことができる。

本発明の凍結物製造方法を行うための条件、すなわち、含水物に対するAFPの添加量、AFPを添加する際の含水物のpH、温度等の条件は、前述した凍結濃縮抑制方法において述べた条件と同様である。

該含水物中における各種成分の濃度に特に制限はなく、好ましくは $1\text{ ng/ml}$ ～ $50\text{ mg/ml}$ 、より好ましくは $50\text{ ng/ml}$ ～ $30\text{ mg/ml}$ である。成分濃度がこの範囲内であると、AFPによる均一分散効果が高く好ましい。

#### 【0028】

##### 【実施例】

以下、本発明の実施例を示すが、本発明は特にこれにより限定されるものではない。

##### 「AFPの調製例1」

以下の条件でナガガジ由来のIII型AFPを調製した。ナガガジ魚体は北海道野付漁業共同組合（北海道野付郡別海町尾岱沼港町179-2）より購入した。

はじめに、ナガガジ魚体1匹を水で良く洗い、包丁にて頭部と内臓を除いた。次に、残りの胴体部分（約120g）を包丁で5等分し、これに同量（120mL）の0.1M重炭酸アンモニウム水溶液（pH=7.9）を加えたものをジュースーミキサー（Tescocom社製PALCOOKIN、容量780mL）に入れて約1分間粉碎した。

こうして得たナガガジすり身を濃縮遠心機（HITACHI himac CF7D2）により3,000rpmにて30分間遠心分離し、上澄み液150mLを回収した。これを透析チューブ（Spectra/Por MWCO: 3,500）に入れ、50mMの酢酸ナトリウム緩衝液（pH=3.7）に対して一晩透析をした。

その後に、透析チューブ内容物を濃縮遠心機（HITACHI himac CF15R）により11,000回転にて30分間遠心分離し、上澄み液150mLを回収した。これを透析チューブ（Spectra/Por、MWCO: 3,500）に入れ、0.1M重炭酸アンモニウム水溶液（pH=7.9）に対して一晩透析をした。

その後に、透析チューブ内容物を濃縮遠心機（HITACHI himac CF15R）により11,000回転にて30分間遠心分離し、上澄み液140mLを回収した。この液をビーカーに入れ活性炭（WAKO特級037-02115）1gを加えて5分間攪拌した。これを注射器フィルター（ポアサイズ: 0.2μm）を用いて濾過したものを凍結乾燥した。

凍結乾燥後の粉末の質量は330mgであった。電気泳動の結果から、この乾燥粉末は、約80%の純度のナガガジ由来のIII型AFP精製物（以下、精製AFP（III）ということがある）であることが判明した。AFPの氷結晶成長阻害能力は、共雑タンパク質による影響を受けないため、この純度は必要にして充分と判断した。

この精製実験を平行的に行うことで、5日間で1,120mgの同純度の精製AFP（III）を得て、以下の凍結濃縮抑制試験1～3に用いた。

#### 【0029】

##### 「凍結濃縮抑制試験1」



プラスチック容器 (105 mm×28 mm×28 mm) を用意してこれに 50 mL の水道水を入れた。この水にパイロット社製の赤色インクを 150  $\mu$ L 滴下し、良く攪拌して赤い色水を作成した。

この色水に対して何も加えないものを A 液 (AFP-) とし、精製 AFP (III) の乾燥粉末を 10 mg (0.02 質量%) 加えて良く攪拌攪拌したものを B 液 (AFP+) とした。

この A 液と B 液をともに家庭用冷凍冷蔵庫の冷凍庫内 (-18℃) に静置し、1 晩放置して凍結させた。

### 【0030】

こうして作製した A 液と B 液の氷の写真を図 3 に示す。

A 液 (AFP-) については、図 2 A～C で示した凍結濃縮メカニズムによって、赤色インク成分が氷の一方向に追いやられて濃縮した結果、氷部分とインク部分とが分離し、周辺部が透明な氷となった (図 3 A)。

一方、B 液 (AFP+) については、全体に赤い色インク成分が分散して赤く着色された氷が得られた (図 3 B)。これは、図 2 D～F で表されるメカニズムによって、AFP が赤色インク成分の凍結濃縮を効果的に抑制した結果であると考えられる。

### 【0031】

さらに、精製 AFP (III) の濃度を 0.01 質量% から 0.1 質量% まで変化させて、上記と同様の試験を行ったところ、精製 AFP (III) の濃度がおよそ 0.03 質量% から 0.05 質量% のときに、最も均質に赤く着色された氷が得られた。

### 【0032】

#### 「凍結濃縮抑制試験 2」

AFP が、他のタンパク質に比べて高い凍結濃縮抑制効果を有していることを示すために、一般的なタンパク質であるニワトリ卵白リゾチームとウシ血清アルブミンについて凍結濃縮抑制効果を調べ、AFP における同効果と比較した。

まず、プラスチック容器 (60 mm×60 mm×55 mm) を用意し、これに 50 mL の水道水を入れた。この水にパイロット社製の赤色インクを 50  $\mu$ L 滴

下し、良く攪拌して赤い色水を作成した。

次に、この赤い色水に対して

A) 何も加えないもの

B) ニワトリ卵白リゾチームの乾燥粉末 16 mg を加えたもの

C) ウシ血清アルブミンの乾燥粉末 16 mg を加えたもの

D) 精製 AFP (III) の乾燥粉末 16 mg (0.03%) を加えたものの 4 種類の試料液 A~D を作成した。いずれの試料液も良く攪拌し、家庭用冷凍冷蔵庫の冷凍庫内 (-18℃) に静置し、1 晩放置して凍結させた。

図 4 の A~D は、上記試料液 A~D の氷の写真である。

図 4 の A、B、C のいずれにおいても、赤色インク成分は氷の内部の特定部分に凍結濃縮された。

一方、図 4 の D に見られるように、AFP を加えた場合については凍結濃縮が著しく軽減され、全体に赤い色インク成分が分散して赤く着色された氷が形成された。

### 【0033】

#### 「凍結濃縮抑制試験 3」

AFP の凍結濃縮抑制効果を利用して、赤色だけでなく、黄色および青色に着色された氷を作成した。

まず、プラスチック容器 (60 mm×60 mm×55 mm) を用意してこれに 50 mL の水道水を入れた。この水にパイロット社製の赤色インクを 50 マイクロリットル滴下したものを A 液 (赤)、ペンテル社製の黄色の絵の具 0.2 g を溶解したものを B 液 (黄)、ペンテル社製の青色の絵の具 0.2 g を溶解したものを C 液 (青) とし、これらを良く攪拌した。

次いで、A~C 液に対して精製 AFP (III) の乾燥粉末 16 mg (0.03 質量%) を加えた。いずれも良く攪拌し、家庭用冷凍冷蔵庫の冷凍庫内 (-18℃) に静置し、1 晩放置して凍結させた。

図 5 の A~C は、上記 A~C 液の氷の写真である。このようにして、赤色、黄色、青色に均一に着色された氷が作成できた。

### 【0034】

**【発明の効果】**

上述のように、本発明においては、水分子及び水分子以外の物質を含む含水物を凍結する際に、該含水物に対してAFPを添加することにより、前記物質の凍結濃縮を抑制することができる。したがって、凍結濃縮による品質の低下や内部構造の破壊、生理活性の消失などを著しく軽減することができる。また、全体に均一に着色された氷を製造することができる。

**【図面の簡単な説明】**

【図1】 AFPを添加しない場合（AFP-）と添加した場合（AFP+）の両方について、水が凍結する様子を表す模式図である。

【図2】 AFPを添加しない場合（AFP-）と添加した場合（AFP+）の各々について、着色水が凍結する様子を表す模式図である。

【図3】 凍結濃縮抑制試験1において、精製AFP（III）を添加しない場合（AFP-）と添加した場合（AFP+）の各々について、着色水を凍結させて作成した氷の写真である。

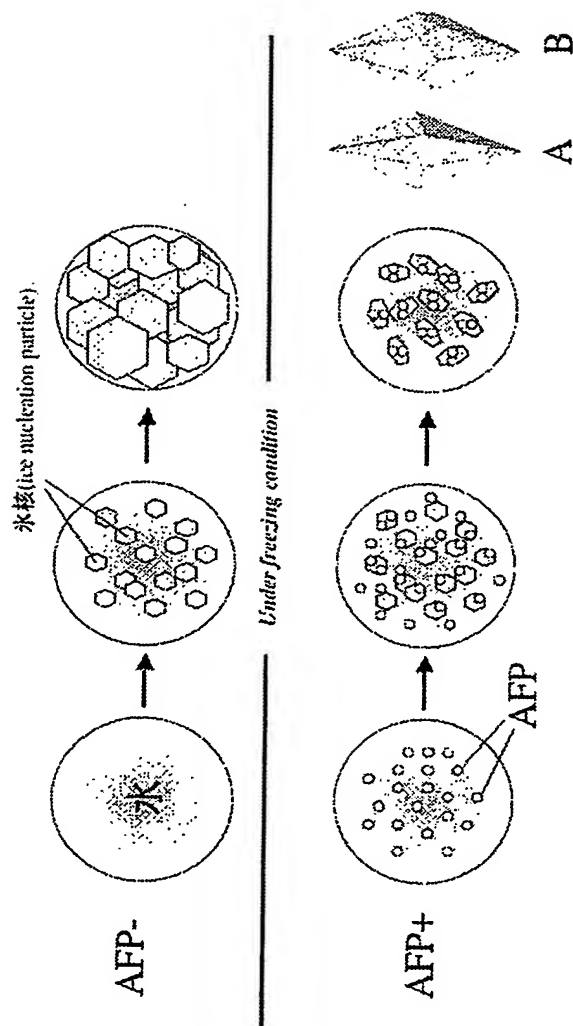
【図4】 凍結濃縮抑制試験2において、色インクを溶かした水を凍結させた氷の写真を、A. タンパク質を添加しない場合、B. ニワトリ卵白リゾチームを添加した場合、C. ウシ血清アルブミンを添加した場合、およびD. 精製AFP（III）を添加した場合について比較したものである。

【図5】 凍結濃縮抑制試験3において、精製AFP（III）が存在する場合（AFP+）について、赤色（A）、黄色（B）、青色（C）のインクを溶かした水を凍結させて作成した氷の写真である。

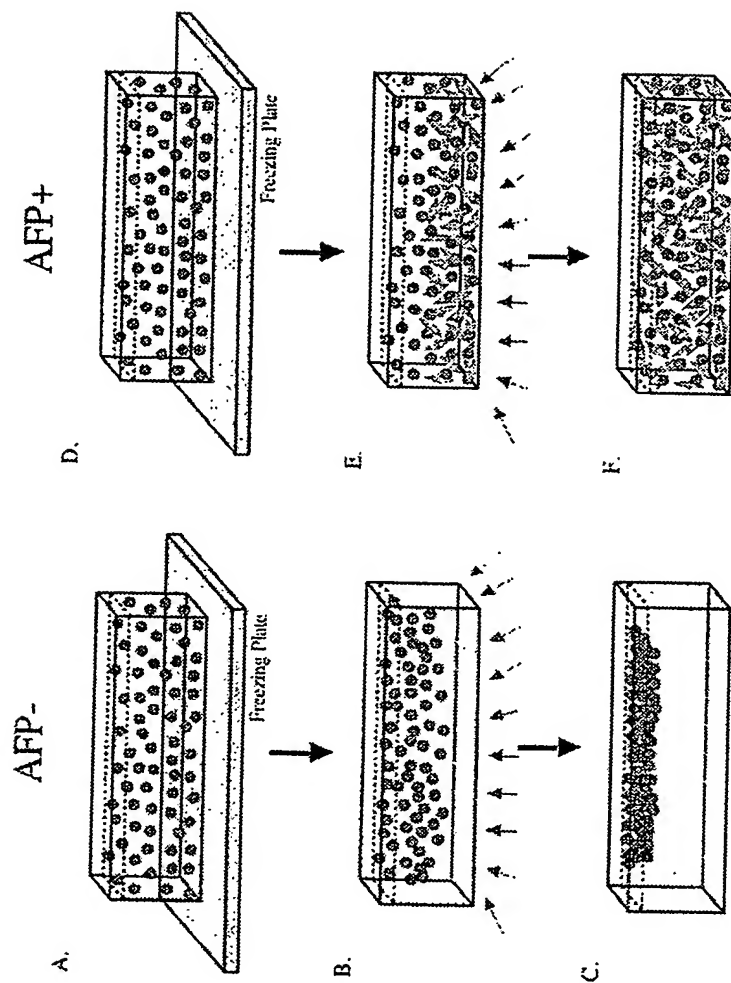
【書類名】

図面

【図 1】

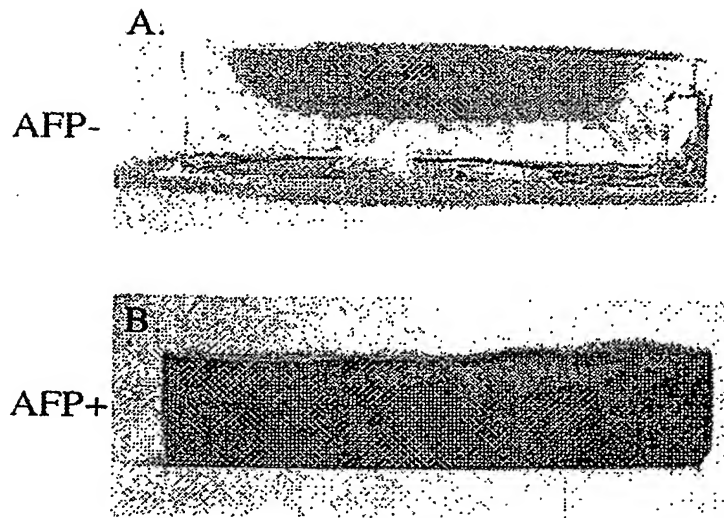


【図 2】



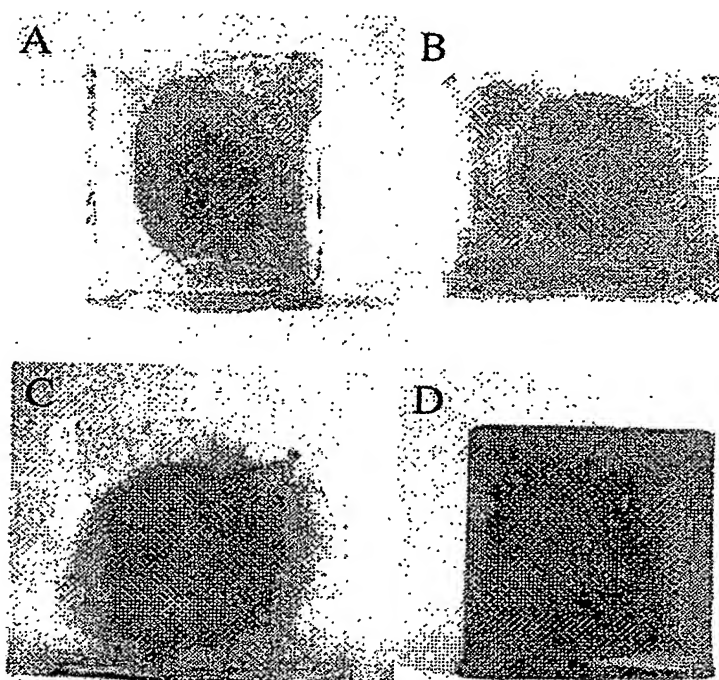


【図 3】



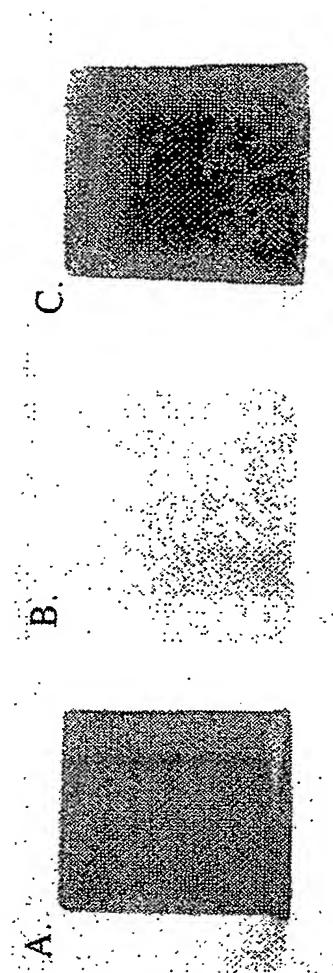


【図 4】





【図 5】







【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 含水物中における物質の凍結濃縮を抑制する方法、生理活性物質の失活を抑制する方法、および成分が均質に拡散した凍結物又は凍結乾燥物を製造する方法を提供すること。

【解決手段】 水分子及び水分子以外の物質を含む含水物を凍結する際、該含水物に不凍タンパク質を添加する。

【選択図】 図 2

## 職権訂正履歴 (職権訂正)

特許出願の番号	特願 2003-078977
受付番号	50300464428
書類名	特許願
担当官	本多 真貴子 9087
作成日	平成 15 年 4 月 3 日

## &lt;訂正内容 1&gt;

訂正ドキュメント

書誌

訂正原因

職権による訂正

訂正メモ

その他欄の記載を訂正しました。

訂正前内容

【その他】 国以外のすべての者の持分 050/100

訂正後内容

【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合 050/100

次頁無

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-078977
受付番号	50300464428
書類名	特許願
担当官	本多 真貴子 9087
作成日	平成15年 6月11日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

## 【識別番号】

301021533

## 【住所又は居所】

東京都千代田区霞が関1-3-1

## 【氏名又は名称】

独立行政法人産業技術総合研究所

## 【特許出願人】

## 【識別番号】

000134970

## 【住所又は居所】

東京都中央区築地6丁目19番20号

## 【氏名又は名称】

株式会社ニチレイ

## 【代理人】

申請人

## 【識別番号】

100106909

## 【住所又は居所】

東京都新宿区高田馬場3-23-3 ORビル

## 【氏名又は名称】

棚井 澄雄

## 【代理人】

## 【識別番号】

100064908

## 【住所又は居所】

東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビル 志賀国際特許事務所

## 【氏名又は名称】

志賀 正武

## 【選任した代理人】

## 【識別番号】

100101465

## 【住所又は居所】

東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビル 志賀国際特許事務所

## 【氏名又は名称】

青山 正和

## 【選任した代理人】

## 【識別番号】

100094400

## 【住所又は居所】

東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビル 志賀国際特許事務所

## 【氏名又は名称】

鈴木 三義

## 【選任した代理人】

次頁有

認定・付加情報 (続き)

【識別番号】	100106057
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビ ル 志賀国際特許事務所
【氏名又は名称】	柳井 則子

次頁無



特願 2003-078977

ページ: 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日

2001年 4月 2日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関1-3-1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所



特願 2003-078977

ページ: 2/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000134970]

1. 変更年月日  
[変更理由]

住 所  
氏 名

1991年 5月31日

住所変更

東京都中央区築地6丁目19番20号  
株式会社ニチレイ